



TITLE:

土壌より単離した有機塩素化合物 分解菌のデハロゲナーゼに関する 研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

越川, 博元

CITATION:

越川, 博元. 土壌より単離した有機塩素化合物分解菌のデハロゲナーゼに関する研究. 京都大学, 1997, 博士(工学)

ISSUE DATE:

1997-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/202304>

RIGHT:

氏 名	こし かわ ひろもと 越 川 博 元
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 1609 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 衛 生 工 学 専 攻
学位論文題目	土壌より単離した有機塩素化合物分解菌のデハロゲナーゼに関する研究

論文調査委員 (主 査)
教 授 寺 島 泰 教 授 田 中 渥 夫 教 授 松 井 三 郎

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生化学的・遺伝子工学的手法も取り入れた廃水処理システムの構築を最終的な目的として、直鎖あるいは芳香族系有機ハロゲン化合物を分解・資化する微生物を土壌から単離し、それらが有する脱ハロゲン化酵素の特性と反応機構、並びに酵素精製法について研究をおこなったもので、6章からなっている。

第1章は序論で、これまでに単離されている菌株やそれらが産するデハロゲナーゼの特性について述べ、これらの反応機構を明らかにする意義を論じている。すなわち多くのデハロゲナーゼの反応機構は不明であり、これを明らかにすることは、デハロゲナーゼの機能強化などを追究するためにも重要であることを指摘している。

第2章では、2-クロロアクリル酸 (2-CAA)、2,4-D あるいは MCPA を分解・資化する菌を土壌より単離・同定し、菌体内のデハロゲナーゼの存在を確認するとともに、その特性について検討している。デハロゲナーゼ活性が最も高い菌株 *Pseudomonas* sp. YL では2-クロロアクリル酸のみならず2-クロロプロピオン酸 (2-CPA) をも分解してデハロゲナーゼを蓄積するが、ポリアクリルアミドゲル電気泳動における酵素の移動度の違いから、両酵素は分子量的には相異なるものであることなどを明らかにしている。

第3章では、*Pseudomonas* sp. YL は炭素源により異なるデハロゲナーゼを誘導することが判明したため、デハロゲナーゼを精製してその特性について検討し、次の結果を得ている。すなわち分子量およびサブユニット構成については、2-CAA デハロゲナーゼは分子量 36,000 のモノマー、L-2-CPA デハロゲナーゼは分子量 27,000 のサブユニット 2 個からなるダイマーであること、2-CAA デハロゲナーゼは D および L 体の 2-CPA に対して立体反転を伴った脱ハロゲン反応を触媒し、それぞれの基質から L および D 体の乳酸を生成するが、L-CPA デハロゲナーゼでは D-2-CPA には作用せず、L-2-CPA に対してのみ立体反転を伴った脱ハロゲン反応を触媒しその結果 D-乳酸を生成すること、さらに熱に対する感受性では、2-CAA デハロゲナーゼは非耐熱性であったが L-CPA デハロゲナーゼは耐熱性を示すこと、また

カルボキシル基を修飾する試薬により L-CPA デハロゲナーゼは活性を失うことから、L-CPA デハロゲナーゼの活性にカルボキシル基が深く関与している可能性があることなどを明らかにしている。

第4章では、*Pseudomonas* sp. YL の L-CPA デハロゲナーゼ遺伝子のクローニングを試み、さらにその大量発現系を構築している。すなわち L-CPA デハロゲナーゼ YL 遺伝子を組み込んだ大腸菌、pKK223-3/DEH は非常に高いデハロゲナーゼ活性を示し、また L-CPA デハロゲナーゼ YL は全可溶性タンパクのおおよそ30%に達することなどを知るとともに、これは使用したベクター pKK223-3 の *tac* プロモーターと L-CPA デハロゲナーゼ YL 遺伝子固有の σ -70 プロモーター双方によるものと考察している。さらに酵素の耐熱性を利用した迅速な精製法を考案することにより、より大量かつ簡便に L-CPA デハロゲナーゼ YL を得ることを可能にしている。

第5章では、化学修飾および部位特異的変異法により、L-CPA デハロゲナーゼ YL の触媒機能に関与するアミノ酸残基の探索をおこなっている。第4章で考案した方法に基づいてすべての変異酵素を精製し、その活性や K_m 値などを測定して次のような結果と結論を得ている。すなわち、化学修飾法により L-CPA DEX YL と L-CPA DEX 109 では酸性アミノ酸、アルギニン、チロシン、ヒスチジン残基に対して修飾を行なうとその活性が消失すること、高度に保存されているアミノ酸残基37個のすべてに対して部位特異的変異を導入することにより得た計65個の変異酵素のうち、Asp10, Asp180, Asn177, Arg41, Lys151, Thr14, Ser175 そして Tyr157 が活性に影響を及ぼすことなどを明らかにしている。特に Asp10 と Asp180 の変異酵素は D10N と D180E でわずかに活性が確認されたものの、そのほかでは全く活性を失ったことから、Asp10 あるいは Asp180 のどちらかのカルボキシル基が、基質の α -炭素に対して求核的な作用をすることによって、脱ハロゲン反応が進行しているものと推論している。

最終章は結論であり、本研究で得られた結果を要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、廃水処理機能を生化学的・遺伝子工学的手法の導入によって高度化するための基礎として、有機ハロゲン化合物の分解・資化微生物を土壌から単離し、微生物が有する脱ハロゲン化酵素の特性と反応機構、並びに酵素精製法について研究したもので、得られた主な成果は次の通りである。

1. ハロ酸あるいは芳香族有機ハロゲン化合物の分解・資化菌を土壌から単離し、デハロゲナーゼの蓄積を確認するとともに、ハロ酸分解菌である *Pseudomonas* sp. YL のデハロゲナーゼの基質特異性、耐熱性などの特性を明らかにした。
2. *Pseudomonas* sp. YL の L-CPA デハロゲナーゼ遺伝子をクローニングし、その遺伝子を用いて L-CPA デハロゲナーゼの大量発現系を構築するとともに、このデハロゲナーゼの耐熱性に基づいて、迅速な酵素精製法を考案した。これらにより、目的酵素のより大量かつ簡便な調製が可能となった。
3. *Pseudomonas* sp. YL の L-CPA デハロゲナーゼあるいは *Pseudomonas putida* 109 の L-CPA デハロゲナーゼの酸性アミノ酸、アルギニン、チロシン、ヒスチジン残基などに対して化学修飾を行ない、これらに強度の失活が生じることを明らかにし、触媒機能に対するこれらアミノ酸残基の関与を指摘した。
4. 高度に保存されているアミノ酸残基37個のすべてに対して部位特異的変異を導入した計65個の変異酵

素のうち, Asp10, Asp180, Asn177, Arg41, Lys151, Thr14, Ser175, および Tyr157 に強度の失活が生じることを明らかにし, 変異酵素の K_m や k_{cat} などに基づき, Asp10 ないしは Asp180 が反応に関与していることを見出した。

以上要するに本論文は, 土壌から単離した直鎖あるいは芳香族系有機ハロゲン化合物分解菌が有する脱ハロゲン化酵素について, その基質特異性や耐熱性などの特性を明らかにし, 酵素の触媒部位を明確にすることにより, 1 次構造と触媒機能や活性との関係について知見を得るとともに, 酵素の大量かつ簡便な精製法を提案したもので, 学術上, 実際上寄与するところが少なくない。よって, 本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。

また, 平成9年2月24日, 論文内容とそれに関連した事項について試問を行なった結果, 合格と認めた。